铜绿丽金龟气味结合蛋白 AcorOBP1 的表达和结合特性分析

王超群[1,2,#]，赵 莹[2,#]，曹雅忠[2]，魏红爽[2]，李克斌[2]，
张 帅[2]，彭 宇[1,*]，尹 姣[2,*]

（1. 湖北大学生命科学学院，湖北省生物资源绿色转化协同创新中心，武汉 430062；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】揭示铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* Motschulsky 气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)基因的表达特征及其与特异信息化合物的结合特性。【方法】通过 RT-qPCR 测定了铜绿丽金龟 *AcorOBP*1 基因的时空表达谱；用原核表达系统对 AcorOBP1 进行表达纯化，然后利用荧光竞争结合实验测定了 AcorOBP1 蛋白与 56 种候选化合物的结合特征。【结果】*AcorOBP*1 基因在铜绿丽金龟卵、1 龄幼虫和成虫等特定发育时期表达，在成虫触角中的表达量显著高于其他部位($P<0.05$)。在被测的 56 种化合物中，AcorOBP1 与 53 种化合物具有结合活性，其中结合能力较强的为小叶女贞 *Ligustrum quihoui* 挥发物水杨酸甲酯和癸醇，解离常数分别为 2.10±0.08 和 5.04±0.59 μmol/L。【结论】铜绿丽金龟 AcorOBP1 结合谱广，该蛋白可能在铜绿丽金龟对寄主植物小叶女贞的定位过程中发挥重要作用。

关键词：铜绿丽金龟；气味结合蛋白；表达谱；荧光竞争结合；解离常数

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2017)04-0363-09

Expression and binding characterization of odorant binding protein 1 (AcorOBP1) in *Anomala corpulenta* (Coleoptera: Scarabaeoidea)

WANG Chao-Qun[1,2,#], ZHAO Ying[2,#], CAO Ya-Zhong[2], WEI Hong-Shuang[2], LI Ke-Bin[2], ZHANG Shuai[2], PENG Yu[1,*], YIN Jiao[2,*] (1. Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Bejing 100193, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to reveal the expression profiles of the odorant binding protein 1 (AcorOBP1) gene in *Anomala corpulenta* Motschulsky and its binding specificity to specific semiochemicals. 【Methods】The spatio-temporal expression profiles of *AcorOBP*1 in *A. corpulenta* was assayed by RT-qPCR. Prokaryotic expression system was used to express and purify AcorOBP1. The binding characteristics of AcorOBP1 to 56 candidate compounds were assayed by fluorescence competitive binding experiment. 【Results】*AcroOBP*1 was expressed in eggs, 1st instar larvae and adults of *A. corpulenta*, and its expression level in adult antenna was extremely significantly higher than those in other adult tissues ($P<0.05$). In the ligand-binding experiment, 53 of the 56 compounds tested were able to bind to AcorOBP1. Particularly, methyl salicylate and decyl alcohol, which are volatile components of the wax leaf privet *Ligustrum quihoui*, showed outstanding binding affinities to AcorOBP1 with the dissociation constants of 2.10±0.08 and 5.04±0.59 μmol/L, respectively. 【Conclusion】AcorOBP1

基金项目：国家自然科学基金项目(31572007, 31371997, 31672317)

作者简介：王超群，女，1991 年 6 月 12 日生，山西太原人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail：18810390324@163.com；赵莹，女，1988 年 2 月 2 日生，河北安国人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态学，E-mail：zhaoying881203@126.com

共同第一作者 Authors with equal contribution

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: pengyu@hubu.edu.cn; jyin@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-01-13；接受日期 Accepted: 2017-02-23

shows binding affinity to a wide range of test compounds and may play a vital role in the localization of host plant *L. quihoui* by *A. corpulenta*.

Key words: *Anomala corpulenta*; odorant binding protein; expression profile; fluorescence competitive binding; dissociation constant

铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* Motschulsky 是我国地下害虫中的优势种群之一,成虫主要取食为害多种农作物和林木等植物的叶片,幼虫为害花生、大豆、玉米、棉花和果树等植物的根系。随着种植结构的调整和园林绿化工程的大面积实施,铜绿丽金龟的种群密度和危害程度日趋严重,给农业生产造成巨大损失(姚庆学等, 2003; 罗宗秀等, 2009)。由于铜绿丽金龟的幼虫生活于地下,难以防治,因此,针对成虫进行无公害防治是控制其危害的关键。同时,利用成虫的寄主选择性进行害虫防治是目前的研究热点。研究表明,铜绿丽金龟对于寄主植物具有明显的取食和产卵选择特性(孙元友等, 2009; 李为争等, 2009),其中,寄主植物小叶女贞 *Ligustrum quihoui* 对铜绿丽金龟雌雄虫均有较好的引诱活性(鞠倩等, 2014)。顺-3-己烯-1-醇、肉桂醛、苯甲醇和水杨酸甲酯等植物挥发物可引起铜绿丽金龟雄虫较强的触角电位活性(李为争等, 2013; 谢明惠等, 2015)。

在昆虫交配、产卵、对寄主植物定位和选择等行为中,其高度敏感的嗅觉器官发挥着重要作用。研究表明,在气味的感知和识别中起主要作用的嗅觉蛋白包括气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、气味受体(odorant receptors, ORs)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)、味觉受体(gustatory receptors, GRs)、感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)和气味降解酶(odorant-degrading enzymes, ODEs)(Leal, 2013)。其中,1981 年首次发现的昆虫气味分子结合蛋白,作为气味分子的携带者是昆虫嗅觉识别的重要基础(Vogt and Riddifoed, 1981)。鳞翅目中,OBPs 主要分为 3 个亚族,即 GOBP1(general odorant binding protein 1),GOBP2(general odorant binding protein 2)和 PBP(pheromone binding protein)(Vogt *et al.*, 1991; Mohl *et al.*, 2002)。GOBP1 和 GOBP2 与普通气味分子结合,PBP 与昆虫性信息素结合。

随着铜绿丽金龟转录组序列的发表(Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015)和铜绿丽金龟雌虫触角的 cDNA 文库的构建(赵莹等, 2015),其嗅觉蛋白的研究拉开了序幕,但是目前尚未见到关于嗅觉相关蛋白基因功能的研究报道。铜绿丽金龟转录组数据结果显示,其气味结合蛋白 AcorOBP1 基因在成虫触角中大量表达,该蛋白可能对铜绿丽金龟寄主植物定位、选择以及交配等行为中发挥着重要作用。本研究采用 RT-qPCR 测定了 AcorOBP1 基因的时空表达谱,并通过荧光竞争结合实验分析了 AcorOBP1 与寄主植物挥发物、性信息素等可能会引起铜绿丽金龟触角电位反应的化合物的结合特性,不仅可以为阐明铜绿丽金龟的嗅觉识别机制奠定基础,而且有助于针对性地开展适用于干扰该昆虫行为的防治技术研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

铜绿丽金龟 *A. corpulenta* 卵、幼虫和成虫于 2016 年 7 - 8 月采集于河北省廊坊市中国农业科学院廊坊科研中试基地,养虫室温度为 25 ± 1℃,光周期为 16L: 8D,环境相对湿度为 70% ± 10%,土壤含水量为 15% ± 3%。取卵及饥饿 24 h 后 1 龄幼虫、2 龄幼虫和 3 龄幼虫,以及饥饿 24 h 后成虫的头、胸、腹、足和触角置液氮中速冻,于 - 80℃保存备用。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plus Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; Go Taq qPCR Master Mix 试剂盒购 Promega 公司; *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 内切酶购自 TaKaRa 公司;载体 pGEM-T Easy Vector 和 T4 DNA Ligase 购自 Promega 公司;感受态细胞、DNA Marker、蛋白 Marker 等购自北京全式金公司;卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、X-Gal、IPTG 和 56 种气味化合物(表 1)购自 Sigma 公司。

1.3 铜绿丽金龟总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

将 1.1 节冻存的样品倒入事先预冷的无 RNA 酶的研钵中,加入液氮,迅速研磨,根据 RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒说明书提取触角 RNA,加入适量 DEPC 水溶解沉淀。按照 cDNA 文库构建试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 第 1 链,用 RNAse-Free Water 定量到 15 ng/μL,作为 RT-qPCR 的模板。

1.4　铜绿丽金龟 *AcorOBP*1 基因时空表达的 RT-qPCR 测定

根据铜绿丽金龟成虫触角转录组数据信息，确定并获得内参基因 *GAPDH*（GenBank 登录号：KM267029）和 *AcorOBP*1（GenBank 登录号：KF445134）序列。利用 Primer Premier 5 软件设计 *GAPDH* 和 *AcorOBP*1 的特异性引物，引物序列如下：

GAPDH-F：5′-GTGGTGCTGCCCAGAACATC-3′；

GAPDH-R：5′-TTGGAACTGGTACACGGAATG-3′。

AcorOBP1-F：5′-TCGTTGGCGATGATGGTG-3′；

AcorOBP1-R：5′-ACAGGGATTCGCTCCAGGT-3′。

以铜绿丽金龟不同发育时期、组织 cDNA 为模板，7500 PCR 仪扩增基因。根据 Go Taq qPCR Master Mix 试剂盒说明书，冰上操作。扩增体系为 20 μL，包括 cDNA 模板 2 μL，Go Taq qPCR Master Mix 10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，其余用 Nuclease-Free Water（ddH_2O）补足。PCR 反应条件：94℃ 2 min；94℃ 30 s，60℃ 1 min，40 个循环。所有样品均设 3 个生物学重复。

*AcorOBP*1 基因在铜绿丽金龟不同发育时期和成虫组织中的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值法进行计算，其中 $\Delta Ct = Ct_{目标基因} - Ct_{内参基因}$，$\Delta\Delta Ct = Ct_{样品} - Ct_{参照物}$，利用 OriginPro 2015 软件作图比较基因的相对表达量。

1.5　铜绿丽金龟 *AcorOBP*1 基因克隆

根据 GenBank 登录的 *AcorOBP*1 基因全长序列，利用 SignalP 3.0 Server 去除信号肽序列，利用 Primer Premier 5.0 设计全长引物，上游引物添加 *Bam*H Ⅰ 酶切位点，下游引物添加 *Hin*d Ⅲ 酶切位点，由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列如下：AcorOBP1-F：5′-GCGGATCCATGTCAGAAGAAATGGAAGAAT-3′；AcorOBP1-R：5′-CAAGCTTGCTTACACTATCATGTAAGACTG-3′。以反转录获得的 cDNA 为模板，用 PCR 仪进行扩增。20 μL 扩增体系：1 μL cDNA 模板，12.5 μL 2 × Taq mixture，上、下游引物（10 μmol / L）各 0.5 μL，其余用 ddH_2O 补足。扩增程序：95℃ 4 min；95℃ 45 s，58℃ 45 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用 TaKaRa 公司胶回收试剂盒获得纯净的目的基因。回收产物与 pGEM-T Easy Vector 连接，转化到 *Trans*5α 感受态细胞，经过蓝白斑筛选后进行测序。通过 DNAMAN 进行序列分析比对，获得序列正确的质粒。

1.6　铜绿丽金龟 *AcorOBP*1 基因原核表达载体的构建及表达纯化

1.6.1　*AcorOBP*1 基因原核表达载体构建：利用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 对克隆质粒 pGEM-T-*AcorOBP*1 和表达载体 pET30a 进行双酶切，用 TaKaRa 公司胶回收试剂盒获得回收产物。通过 T4 DNA 连接酶将两者进行连接，转化到 *Transetta*（DE3）感受态细胞，经筛选测序获得序列正确的表达质粒。

1.6.2　AcorOBP1 表达纯化：表达菌液 37℃ 振荡培养至 OD_{600} 在 0.8 ~ 1.0 之间，加入终浓度为 1 mmol/L IPTG，37℃ 180 r/min 诱导 2 h。离心收集菌体，加入裂解液，超声破碎后离心取上清，用于蛋白纯化。使用 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 填料进行亲和层析蛋白纯化，纯化后蛋白用肠激酶酶切除 His-tag 标签，再次纯化后定量至 2 μmol/L，置于 −70℃ 备用。

1.7　铜绿丽金龟 AcorOBP1 荧光竞争结合

使用 970CRT 荧光分光光度计（上海精密科学公司），石英比色皿宽度为 1 cm，激发狭缝为 10 nm，灵敏度为 1，激发光波长为 337 nm，扫描波长的范围设定为 350 ~ 550 nm。

向荧光比色皿中加入 2 mL 2 μmol/L AcorOBP1 蛋白溶液，随后连续加入梯度的荧光探针 1-NPN 储备液至荧光值达到饱和。根据最大荧光强度值，绘制标准曲线，利用软件 Graph Pad Prism 5.0 中 Scatchard 方程计算 AcorOBP1 和荧光探针 1-NPN 的解离常数 $K_{[1\text{-}NPN]}$。

选取小叶女贞等寄主植物挥发物（郭立春，2011；王琦，2014）和多种金龟子性信息素（Leal *et al.*，1993；王惠等，2002；胡祖庆等，2005；罗宗秀，2010）共计 56 种可能与铜绿丽金龟行为相关的化合物为配体，研究 AcorOBP1 的结合特性。以甲醇为溶剂将各气味化合物配制成 1 mmol/L 的溶液试样，首先在 2 mL 2 μmol/L AcorOBP1 蛋白溶液中加入 2 μL 2 mmol/L 1-NPN，随后逐次加入待测气味标样溶液至蛋白/1-NPN 混合物中，使其终浓度分别为 2，4，6，8，…，50 μmol/L。假设 AcorOBP1 的蛋白活性为 100%，且在饱和状态下配体与蛋白按照 1∶1 分子比例结合，根据公式 $K_d = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-}NPN]/K_{[1\text{-}NPN]})$ 计算蛋白与配体的竞争解离常数 K_d 值，其中 $[IC_{50}]$ 为配体置换 50% 的 1-NPN 时的配体浓度，[1-NPN] 为自由 1-NPN 探针的浓度，$K_{[1\text{-}NPN]}$ 为 AcorOBP1/1-NPN 的解离常数。

1.8 数据统计分析

数据分析采用 SPSS17.0 软件；铜绿丽金龟不同发育阶段、成虫不同组织间以及 AcorOBP1 与不同化合物的结合特性等差异分析采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，多重比较采用 Duncan 氏新复极差法进行显著性检验，显著水平设为 $P<0.05$。

2 结果

2.1 *AcorOBP*1 基因的时空表达

在铜绿丽金龟不同发育阶段，*AcorOBP*1 基因表达量存在明显差异；其中，在铜绿丽金龟卵、1 龄幼虫和成虫中均检测到了 *AcorOBP*1 基因的表达，但是在 2 龄和 3 龄幼虫中未检测到(图 1：A)。在成虫不同的组织中，*AcorOBP*1 基因表达量差异更明显，触角中的表达量显著高于其他组织中的相对表达量($F=18.997$, $P<0.05$)(图 1：B)。

2.2 AcorOBP1 的表达与纯化

*AcorOBP*1 基因与表达载体 pET30a 连接，转入表达感受态细胞 *Transetta*(DE3)，经过 IPTG 诱导后含有 His-tag 的目的蛋白分子量约在 15 ~ 25 kD 之间，符合预期实验设想。经过重组肠激酶酶切后，获得不含 His-tag 的单一条带的目的蛋白分子量约在 10 ~ 15 kD 之间，用于荧光竞争结合试验(图 2)。

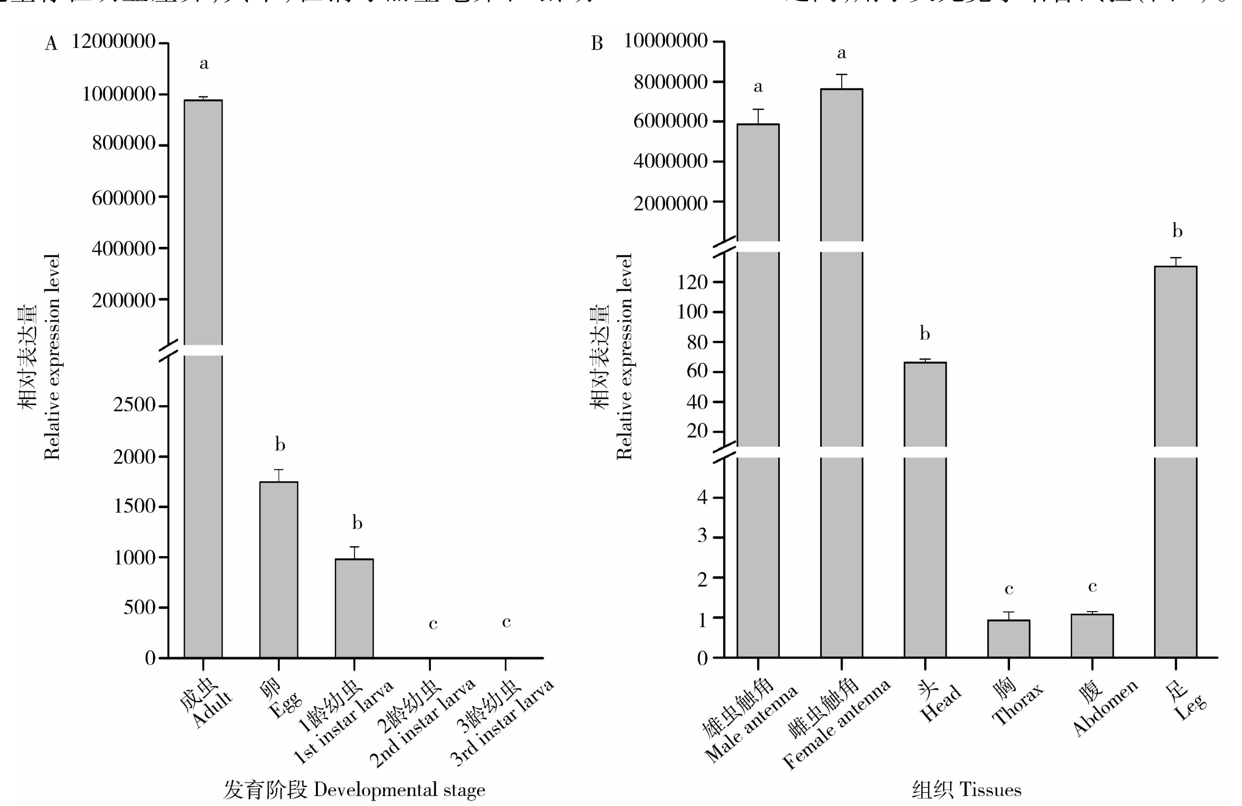


图 1 铜绿丽金龟 *AcorOBP*1 基因在不同发育阶段(A)和成虫组织中(B)的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *AcorOBP*1 gene in different developmental stages (A) and adult tissues (B) of *Anomala corpulenta*

图中数据为平均值 ± 标准差，柱上标记的不同字母代表不同发育阶段、成虫不同组织部位的表达量存在显著差异 $P<0.05$(Duncan 氏新复极差法检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. Different letters above bars indicate significant difference in relative expression level in different developmental stages and different adult tissues at the 0.05 level (Duncan's multiple range test).

2.3 AcorOBP1 荧光竞争结合

纯化的 AcorOBP1 蛋白和荧光探针 1-NPN 结合，得到 AcorOBP1 蛋白的标准曲线(图 3)。利用 Scatchard 方程得出 AcorOBP1 的解离常数为 5.37 μmol/L。AcorOBP1 与 56 种化合物的结合能力分析结果表明，AcorOBP1 与不同挥发物的结合能力存在显著差异(表 1)。其中，对其寄主植物小叶女贞的不同挥发物的结合能力也明显不同(图 4)，水杨酸甲酯在 2.50 μmol/L 时，荧光值已经下降到 50%，表明水杨酸甲酯与 AcorOBP1 有超强的结合能力。AcorOBP1 与不同金龟子的性信息素也存在一定的结合能力(图5)。其与华北大黑鳃金龟 *Holotrichia*

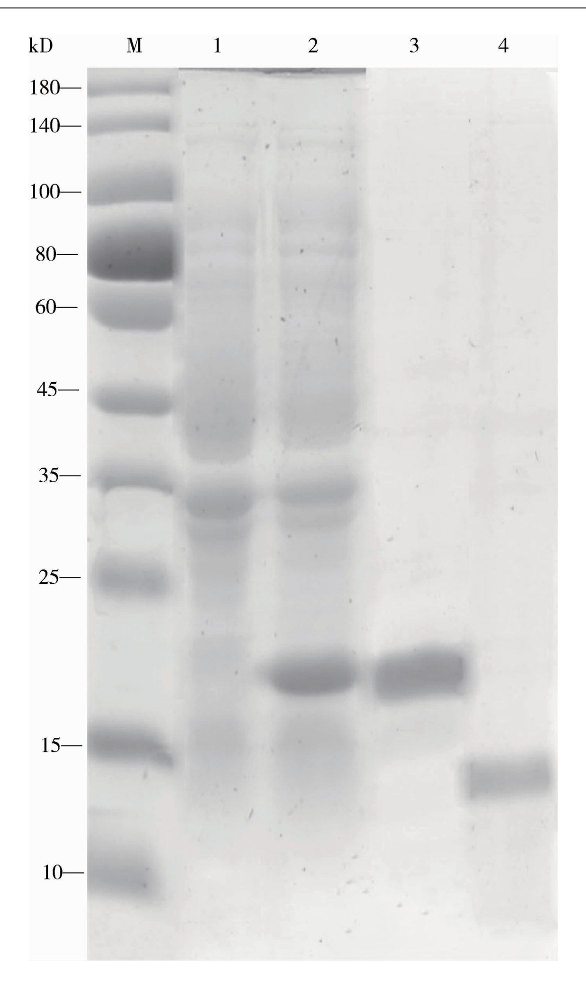


图 2 重组蛋白 pET30a-AcorOBP1 的表达纯化

Fig. 2 Expression and purification of the recombinant protein pET30a-AcorOBP1

M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：未诱导的 pET30a-AcorOBP1 菌体 Non-induced pET30a-AcorOBP1 in *Escherichia coli*；2：经过 IPTG 诱导表达的 pET30a-AcorOBP1-His 目的蛋白 Expressed protein pET30a-AcorOBP1-His after induction by IPTG；3：经过镍柱纯化获得 pET30a-AcorOBP1 蛋白 Purified protein pET30a-AcorOBP1 through Ni-NTA column；4：经过重组肠激酶切除 His 标签后的 pET30a-AcorOBP1 蛋白 Purified protein pET30a-AcorOBP1 with His-tag cleaved by rbEK.

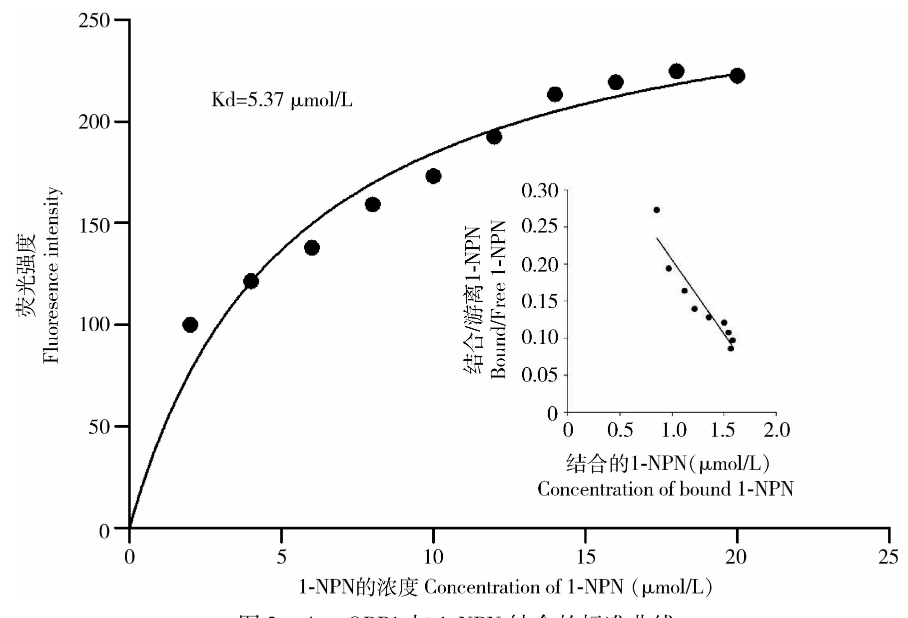


图 3 AcorOBP1 与 1-NPN 结合的标准曲线

Fig. 3 Binding curve of AcorOBP1 to 1-NPN

表 1　AcorOBP1 与配体的结合特性

Table 1　Binding properties of AcorOBP1 with different ligants

化合物 Compounds	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
烃类 Hydrocarbons		
正己烷 Hexane	16.00 ±0.06	13.45 ±0.05 t
正庚烷 Heptane	12.00 ±0.70	10.08 ±0.59 w
正辛烷 Octane	15.00 ±0.02	12.61 ±0.02 u
正壬烷 Nonane	10.00 ±0.14	8.40 ±0.12 y
正癸烷 Decane	40.00 ±0.25	33.61 ±0.21 d
正十一烷 Undecane#	38.00 ±0.35	31.93 ±0.29 e
十四烷 Tetradecane	20.00 ±0.14	16.81 ±0.12 op
十五烷 Pentadecane	17.00 ±0.47	14.29 ±0.40 s
十六烷 Hexadecane#	30.00 ±0.36	25.21 ±0.30 j
醛类 Aldehydes		
反-2-已烯醛 *Trans*-2-Hexenal	23.50 ±0.25	19.75 ±0.21 n
肉桂醛 Cinnamaldehyde	23.50 ±0.24	19.75 ±0.20 n
苯甲醛 Benzal dehyde	28.50 ±0.40	23.95 ±0.34 k
壬醛 1-Nonanal#	14.00 ±0.45	11.76 ±0.39 v
辛醛 1-Octanal#	13.00 ±0.39	10.92 ±0.33 w
癸醛 1-Decanal#	10.00 ±0.25	8.40 ±0.21 y
庚醛 1-Heptanal#	13.50 ±0.12	11.34 ±0.10 vw
已醛 1- Hexanal#	18.00 ±0.03	15.13 ±0.03 qr
酯类 Esters		
L-脯氨酸乙酯 L-Proline ethyl ester*	33.5 ±0.72	28.15 ±0.61 h
苯甲酸已酯 Hexyl benzoate	7.00 ±0.53	5.88 ±0.45 α
L-异亮氨酸甲酯 L-Isoleucine methyl ester*	16.00 ±0.19	13.45 ±0.16 t
甘氨酸乙酯 Glycine ethyl ester*	16.00 ±0.11	13.45 ±0.09 r
水杨酸甲酯 Methyl salicylate#	2.5 ±0.09	2.10 ±0.08 γ
醇类 Alcohols		
橙花叔醇 Nerolidol	11.00 ±0.45	9.24 ±0.38 vx
1-庚醇 1-Heptanol	15.00 ±0.64	12.60 ±0.54 su
1-十一醇 1-Undecanol	15.50 ±0.59	13.03 ±0.50 rs
1-壬醇 1-Nonanol	17.50 ±0.27	14.71 ±0.23 p
十六烷醇 Hexadecanol	18.50 ±0.31	15.55 ±0.26 p
反-2-已烯醇 *Trans*-2-Hexenol	22.50 ±0.03	18.90 ±0.03 no
1-已醇 1-Hexanol	23.50 ±0.66	19.75 ±0.55 n
顺-2-已烯醇 *Cis*-2-Hexenol	24.50 ±0.17	20.59 ±0.14 m
1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	24.50 ±0.81	20.59 ±0.68 m
顺-3-已烯醇 *Cis*-3-Hexenol#	27.50 ±0.06	23.11 ±0.05 l
α-松油醇 α-Terpineol	33.50 ±0.06	15.02 ±0.05 qr
香叶醇 Geraniol	36.00 ±0.13	30.25 ±0.11 fg
R-芳樟醇 *R*-Linalool*	36.50 ±0.13	30.67 ±0.11 f
4-叔丁基环已醇 4-Tert-butyl cyclohexanol	18.00 ±0.71	15.13 ±0.60 qr
辛醇 1-Octanol	13.50 ±0.67	11.34 ±0.56 vw
癸醇 n-Decanol#	6.00 ±0.70	5.04 ±0.59 β
十二醇 1-Dodecanol	5.50 ±0.01	4.62 ±0.01 β
苯甲醇 Benzyl alcohol	9.00 ±0.30	7.57 ±0.25 z
其他 Others		
β-紫罗兰酮 β-Ionone	6.00 ±0.07	5.04 ±0.06 β
α-紫罗兰酮 α-Ionone	9.00 ±0.07	7.57 ±0.06 z
环已烷酮 Cyclohexane ketone	22.00 ±0.16	18.49 ±0.13 o
6-甲基-5-庚烯酮-2-酮 6-Methyl-5-hepten-2-one	26.50 ±0.11	11.88 ±0.09 tv
月桂烯 Myrcene	32.00 ±0.54	26.89 ±0.45 j
柠檬烯 Limonene#	35.50 ±0.23	29.83 ±0.19 g
莰烯 Camphene	40.50 ±0.16	34.03 ±0.13 d
4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	41.50 ±1.42	34.87 ±1.19 c
α-蒎烯 α-Pinene#	43.50 ±0.11	36.55 ±0.09 b
β-蒎烯 β-Pinene#	50.00 ±0.40	42.02 ±0.34 a
丁子香酚 Eugenol	20.00 ±0.37	16.81 ±0.31 op
苯甲醚 Aniseole	–	–
叔丁基苯酚 Tert-butylphenol	–	–
2-十三烷酮 2-Tridecanone	15.50 ±0.15	13.03 ±0.13 tu
β-石竹烯 β-Caryophyllene	–	–
(*R*, *Z*)-5-(-)-(1-辛烯基)二氢呋喃酮 (*R*, *Z*)-5-(-)-(1-Octenyl) dihydrogen furan	23.30 ±0.69	18.64 ±0.58 o

IC_{50}：结合 50% 1-NPN 时的化合物浓度 Concentration of compounds binding to 50% 1-NPN；K_i：蛋白与化合物的竞争解离常数 Competitive dissociation constant of a protein with a compound. 数据为平均值 ± 标准误；K_i 数据后不同小写字母表示蛋白与不同化合物的结合存在显著差异 $P < 0.05$（Duncan 氏新复极差法检验）。Data in the table are mean ± *SE*. Different small letters following the data of K_i indicate significant difference in binding capabilities of different compounds to AcorOBP1 at the 0.05 level (Duncan's multiple range test). –：不结合 Non-binding；#小叶女贞挥发物 Volatiles of *Ligustrum quihoui*；*性信息素 Sex pheromone.

oblita 性信息素成分甘氨酸乙酯结合能力最强，而铜绿丽金龟性信息素 5-十四烷基二氢 2(3H)-呋喃酮在 23.30 μmol/L 时，荧光值也可下降到 50%，表明其与 AcorOBP1 有较强的结合能力。

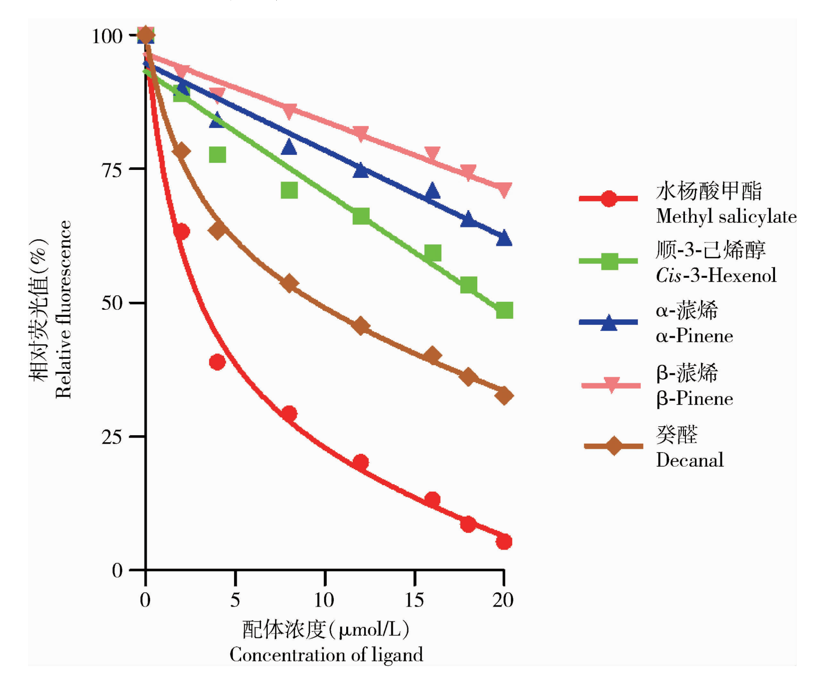


图 4 AcorOBP1 与小叶女贞挥发物的结合曲线

Fig. 4 Binding curves of AcorOBP1 to volatiles of *Ligustrum quihoui*

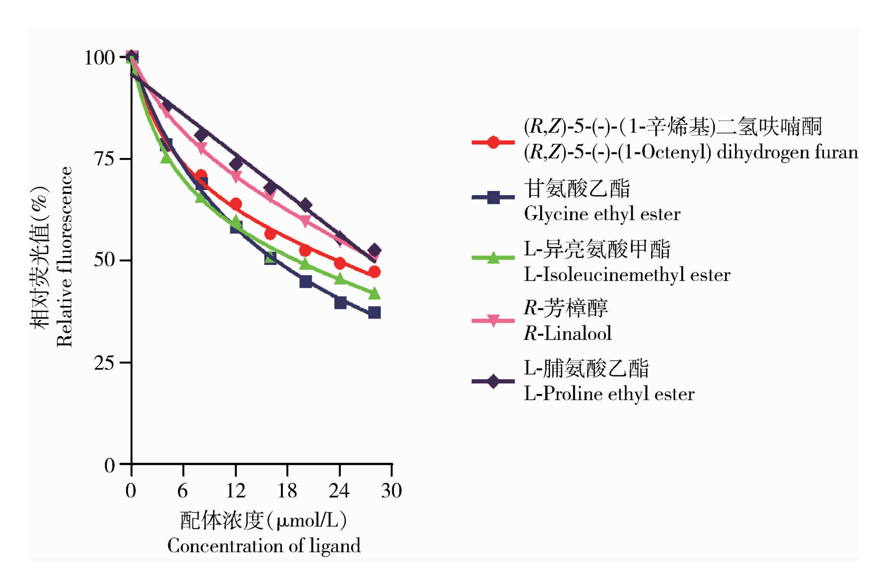


图 5 AcorOBP1 与不同金龟子性信息素的结合曲线

Fig. 5 Binding curves of AcorOBP1 to different sex pheromones of scarab beetles

3 讨论

昆虫 OBP 大多被认为主要在嗅觉器官表达，但是随着研究的广泛开展，越来越多的研究发现 OBP 也可以在非嗅觉组织以及不同发育阶段表达(Jin *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016)。本研究荧光定量结果表明，*AcorOBP1* 基因与大多数 OBP 基因一样在铜绿丽金龟触角中的表达量显著高于其他非嗅觉器官($P<0.05$)，说明该蛋白可能在其嗅觉识别过程中发挥作用。另外，本研究发现，*AcorOBP1* 基因在铜绿丽金龟卵和 1 龄幼虫亦有较高的表达，这一结果与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 *SexiOBP13* 基因的研究结果类似，即该蛋白不仅在成虫的嗅觉识别中

发挥作用,同时可能影响低龄幼虫对寄主的选择性(Jin *et al*., 2015)。

OBPs 能够广泛结合气味分子已被大量实验所证实(Liu *et al*., 2015; Yuan *et al*., 2015; Mao *et al*., 2016; 房迟琴等, 2016)。本研究选取了由铜绿丽金龟的寄主植物挥发物、不同金龟子性信息素等 56 种化合物研究 AcorOBP1 的结合特性,结果表明,53 种化合物与蛋白有一定的结合能力,证明了 AcorOBP1 结合的广谱性。同时研究发现,在一定范围内,蛋白与化合物结合能力与碳链的长短有关。随着碳原子数的增加,配基与蛋白的结合能力越弱(表 1),与前人的研究结果一致(Deng *et al*., 2012)。

小叶女贞是铜绿丽金龟喜食的园林植物(鞠倩等, 2014)。小叶女贞挥发物包括壬醛、水杨酸甲酯、顺-3-己烯醇、癸醇、α-蒎烯、β-蒎烯、正十一烷、十六烷、辛醛、癸醛、庚醛、己醛、柠檬烯等(郭立春, 2011; 王琦, 2014)。本研究表明,AcorOBP1 与小叶女贞不同的挥发物的结合能力不同。其对于能够引起铜绿丽金龟雌、雄成虫强烈触觉反应的水杨酸甲酯(李为争等, 2013)结合能力最强(图 4),表明 AcorOBP1 在铜绿丽金龟对水杨酸甲酯的识别过程中发挥重要作用。其对于癸醇、癸醛等挥发物也具有较强的结合能力。另外,目前有研究发现多种昆虫 OBPs 均可以区别同一化合物的同分异构体(Wang *et al*., 2013; Li *et al*., 2016)。本研究表明,AcorOBP1 对于同属小叶女贞挥发物的同分异构体 α-蒎烯和 β-蒎烯的结合能力也有一定差异,说明铜绿丽金龟嗅觉识别的高度灵敏性。植物源引诱剂的田间筛选发现肉桂醛和苯甲醇混合作用对铜绿丽金龟雄虫有较强的引诱活性(李为争等, 2009)。本实验表明 AcorOBP1 对苯甲醇结合能力较强,可能在寄主植物选择时起到一定的作用,但是对肉桂醛结合能力一般,肉桂醛可能由其他 OBP 蛋白结合进行识别。

赵莹等(2015)对 *AcorOBP1* 基因进行分析发现,该基因与其他昆虫的 PBP1 基因同源性较高。因此,本研究也对 AcorOBP1 与金龟科已知的性信息素的结合特性开展了研究。其中,甘氨酸乙酯和脯氨酸乙酯为华北大黑鳃金龟的性信息素(王惠等, 2002; 胡祖庆等, 2005);L-异亮氨酸甲酯、*R*-芳樟醇为暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 的性信息素(Leal *et al*., 1993);罗宗秀(2010)初步确定铜绿丽金龟的性信息素为 5-十四烷基二氢 2(3H)-呋喃酮。本研究表明,AcorOBP1 不仅与自身性信息素具有一定结合能力,对其他 4 种性信息素也有不同程度的结合作用(图 5),但是其与性信息素的结合能力明显弱于与寄主植物挥发物的结合。因此,我们推测,该蛋白主要功能可能是识别寄主植物的挥发物。

本研究纯化获得 AcorOBP1 蛋白并进行功能分析,发现其与化合物具有广泛的结合能力,尤其对寄主植物小叶女贞的某些挥发性气味具有超强的结合能力,推测 AcorOBP1 蛋白在铜绿丽金龟对小叶女贞的定位过程中发挥重要的作用。本研究结果为探究铜绿丽金龟的嗅觉识别机制提供了基础的数据,为控制该害虫的为害提供了一定的思路。但本研究仅是初步明确了 AcorOBP1 蛋白的时空定位和功能分析,对于该蛋白与其他嗅觉蛋白的协同作用以及其与行为反应的关系等许多问题需要进一步探讨。

参考文献(References)

Chen H, Lin L, Xie M, Zhang G, Su W, 2014. *De novo* sequencing, assembly and characterization of antennal transcriptome of *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Rutelidae). *PLoS ONE*, 9(12): e114238.

Deng SS, Yin J, Zhong T, Cao YZ, Li KB, 2012. Function and immunocytochemical localisation of two novel odorant-binding proteins in olfactory sensilla of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chem. Senses*, 37: 141-150.

Fang CQ, Zhang XX, Liu DD, Li KB, Zhang S, Cao YZ, Fan D, Yin J, 2016. Cloning and functional analysis of an odorant-binding protein HparOBP15a gene from *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Entomol. Sin*., 59(3): 260-268. [房迟琴, 张鑫鑫, 刘丹丹, 李克斌, 张帅, 曹雅忠, 樊东, 尹姣, 2016. 暗黑鳃金龟气味结合蛋白 HparOBP15a 基因的克隆及功能分析. 昆虫学报, 59(3): 260-268]

Guo LC, 2011. Compositions Content of Five Tree Species' VOCs: A Case Studies in Nanjing Purple Mountain. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [郭立春, 2011. 南京紫金山 5 个树种挥发性有机物的组份研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Hu ZQ, Kang JX, Zhao HY, Shi WD, 2005. Bioassay of attractants of *Holotrichia oblita* Faldermann. *Shaanxi J. Agric. Sci*., (4): 46-48. [胡祖庆, 亢菊侠, 赵惠燕, 时卫东, 2005. 华北大黑鳃金龟引诱剂生物测定初探. 陕西农业科学, (4): 46-48]

Jin R, Liu NY, Li Y, Dong SL, 2015. A larval specific OBP able to bind the major female sex pheromone component in *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Integr. Agric*., 14(7): 1356-1366.

Ju Q, Li X, Jiang XJ, Zhao ZQ, Jiang YL, Qu MJ, 2014. Behavioral responses of three scarab beetles to host plants. *Plant Protect*., 40(4): 76-79. [鞠倩, 李晓, 姜晓静, 赵志强, 姜玉兰, 曲明静, 2014. 3 种金龟甲对寄主植物的行为反应研究. 植物保护,

40(4)：76－79]

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373－391.

Leal WS, Sawada M, Matsuyama S, Kuwahara Y, Hasegawa M, 1993. Unusual periodicity of sex pheromone production in the large black chafer *Holotrichia parallela*. *J. Chem. Ecol.*, 19(7): 1381－1391.

Li GW, Zhang Y, Li YP, Wu JX, Xu XL, 2016. Cloning, expression, and functional analysis of three odorant-binding proteins of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 91(2): 67－87.

Li WZ, Yang L, Shen XW, Yuan YH, Yuan GH, 2013. Prescription screening and field evaluation of broad spectrum attractants of scarab beetles from *Ricinus communis*. *Chin. J. Eco-Agric.*, 21(4): 480－486.［李为争，杨雷，申小卫，袁萤华，原国辉，2013. 金龟甲蓖麻源引诱剂的配方筛选及田间效果评价. 中国生态农业学报，21(4)：480－486］

Li WZ, Yuan YH, Yuan GH, Luo MH, Guo XR, 2009. Selection and feeding responses of *Anomala corpulenta* adults to different plant leaves. *Chin. J. Ecol.*, 28(9): 1905－1908.［李为争，袁莹华，原国辉，罗梅浩，郭线茹，2009. 铜绿丽金龟对不同植物叶片的选择和取食反应. 生态学杂志，28(9)：1905－1908］

Li X, Ju Q, Jie W, Li F, Jiang X, Hu J, Qu MJ, 2015. Chemosensory gene families in adult antennae of *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelinae). *PLoS ONE*, 10(4): e0121504.

Liu NY, Yang K, Liu Y, Xu W, Anderson A, Dong SL, 2015. Two general-odorant binding proteins in *Spodoptera litura* are differentially tuned to sex pheromones and plant odorants. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 180: 23－31.

Luo ZX, 2010. Investigation of Scarab Beetle and Study on Identification and Application of Sex Pheromone of Dominant Species. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.［罗宗秀，2010. 金龟甲调查及其优势种性信息素鉴定与应用研究. 北京：中国农业科学院硕士学位论文］

Luo ZX, Li KB, Cao YZ, Yin J, Zhang J, Zhang JT, Shang GQ, 2009. Investigations on soil-inhabiting pests in peanut fields in Henan. *Plant Protect.*, 35(2): 104－108.［罗宗秀，李克斌，曹雅忠，尹姣，张杰，张静涛，尚光强，2009. 河南部分地区花生田地下害虫发生情况调查. 植物保护，35(2)：104－108］

Ma L, Li ZQ, Bian L, Cai XM, Luo ZX, Zhang YJ, 2016. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. *PLoS ONE*, 11(3): e0149591.

Mao A, Zhou J, Mao B, Zheng Y, Wang YF, Li DQ, Wang P, Liu KY, Wang XQ, Ai H, 2016. Sex pheromone recognition and characterization of three pheromone-binding proteins in the legume pod borer, *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae). *Sci. Rep.*, 6: 34484.

Mohl C, Breer H, Krieger J, 2002. Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. *Invert. Neurosci.*, 4(4): 165－174.

Sun YY, Li Y, Xue JH, 2009. The life habit and control technology of *Anomala corpulenta* Motschulsky. *Jilin Forest. Sci. Technol.*, 38(5): 54－55.［孙元友，李颖，薛俊华，2009. 铜绿丽金龟的生活习性及其防治技术. 吉林林业科技，38(5)：54－55］

Vogt RG, Riddifoed LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161－163.

Vogt RG, Rybczynsk IR, Lerner MR, 1991. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.*, 11(10): 2972－2984.

Wang B, Guan L, Zhong T, Li K, Yin J, Cao YZ, 2013. Potential cooperations between odorant-binding proteins of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, 8(12): e84795.

Wang H, Zhang X, Mi HB, 2002. The separation and identification of sex pheromone components of *Holotrichia oblita* Faldermann. *J. Northwest Sci-Tech Univ. Agric. Forest.* (*Nat. Sci. Ed.*), 30(2): 91－95.［王惠，张兴，米宏彬，2002. 华北大黑鳃金龟性信息素组分的分离与鉴定. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，30(2)：91－95］

Wang Q, 2014. Volatile Organic Compounds Analysis of 22 Garden Plants and Analytic Hierarchy Process Evaluation. MSc Thesis, Zhejiang A&F University, Hangzhou.［王琦，2014. 22 种园林植物挥发性有机物成分分析及其层次分析法评价. 杭州：浙江农林大学硕士学位论文］

Xie MH, Chen HL, Yi JK, Li KB, Zhang J, Su WH, 2015. Electroantennographic and behavioral responses of *Anomala corpulenta* to plant volatiles. *Plant Protect.*, 41(1): 33－38.［谢明惠，陈浩梁，衣建坤，李克斌，张杰，苏卫华，2015. 铜绿丽金龟对植物源挥发物的触角电位和行为反应. 植物保护，41(1)：33－38］

Yao QX, Zhang Y, Ding Y, 2003. Review on the advance and prospect of scarabs control research. *J. Northeast Forest. Univ.*, 31(1): 64－66.［姚庆学，张勇，丁岩，2003. 金龟子防治研究的回顾与展望. 东北林业大学学报，31(1)：64－66］

Yuan HB, Ding YX, Gu SH, Sun L, Zhu XQ, Liu HW, Dhiloo KH, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS ONE*, 10(10): e0140562.

Zhao Y, Yin J, Li KB, Cao YZ, Wu JX, 2015. Construction and quality analysis of a full-length cDNA library from antennae of *Anomala corpulenta* Motschulsky. *Plant Protect.*, 41(1): 108－115.［赵莹，尹姣，李克斌，曹雅忠，仵均祥，2015. 铜绿丽金龟雌虫触角全长 cDNA 文库的构建及质量分析. 植物保护，41(1)：108－115］

（责任编辑：马丽萍）